



植物における精密ゲノム編集技術ジーンターゲティングの高度化と汎用化に関する研究

農研機構生物機能利用研究部門 横井 彩子

はじめに

2020年にノーベル化学賞を受賞したゲノム編集技術は、基礎研究や医療分野においてはもちろんのこと、2021年にゲノム編集で品種改良されたトマトの青果販売が始まるなど、幅広い分野において重要な技術となりつつある。ゲノム編集技術には大きく分けて2つの技術がある(図1)。一つは、CRISPR/Cas9などの人工制限酵素で標的遺伝子上にDNA二重鎖切断(DSBs)を誘発し、DNA末端が再結合される修復(非相同末端結合)過程で生じるエラーを利用して標的遺伝子に挿入・欠損変異などを導入して破壊する「標的変異」技術(図1A)である。この技術は非常に効率が高く、前述のゲノム編集トマトをはじめ既に様々な植物種において適用されており完成された技術と言える。しかし、標的遺伝子に導入する変異を制御することはできず、機能獲得型変異体の作出はこの技術だけでは困難である。一方、もう一つの技術である「標的組換え(ジーンターゲティング, GT)」技術(図1B)は、標的遺伝子上に生じたDSBsを相同組換え経路により修復する過程で、外来DNA(相同組換えの鋳型DNA)として導入した配列をコピーペーストするため、任意の変異(アミノ酸置換, ドメイン交換, ノックインなど)を標的遺伝子に導入することが可能である。しかしながら、高等植物では相同組換え頻度が低いためGT効率が非常に低いのが問題点である。そこで筆者らは、イネやタバコを材料として汎用的なGT系の確立に取り組んできた。本要旨では、その研究の概要について紹介する。

1. GT細胞の効率的な選抜と正確なマーカー除去法の組み合わせによる標的遺伝子の精密改変

1-1. *piggyBac* トランスポゾンの転移を利用した正確なマーカー除去法の確立

前述のとおり、高等植物を含めた高等真核生物ではGT効率

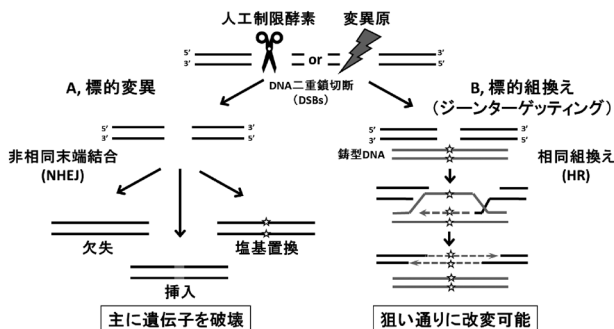


図1. ゲノム編集の主な2つの技術の概略図
A, 人工制限酵素により誘発したDSBsを修復する過程で生じるエラーを利用して標的遺伝子を主に壊す技術。
B, 任意の変異(☆)を挿入した鋳型DNAを細胞内に導入し、その配列を相同組換え修復により標的遺伝子にコピーペーストする。

が非常に低いため、動物細胞においてポジティブ・ネガティブ選抜という方法が確立され、イネにも適用されてきた。この方法は、細胞内に導入したGTベクターがランダムにゲノムに挿入された細胞をネガティブ選抜マーカー(致死遺伝子)の発現で排除し、相同組換えによりGTベクターが正確にゲノムに取り込まれたGT細胞のみをポジティブ選抜マーカーの発現により濃縮できる。しかしこの方法を利用すると、標的遺伝子座周辺にポジティブ選抜マーカー発現カセットが挿入されてしまうため、標的遺伝子上に目的の変異のみを残すためにはマーカーを痕跡無く除去する必要があるが、これまで足跡を残さないマーカー除去法は開発されていなかった。そこで筆者らは、フットプリントを残さずに転移することが知られていた昆虫由来の*piggyBac* トランスポゾンに着目し¹⁾、GTで改変した標的遺伝子座からのマーカー除去に適用した(図2)。ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTで標的遺伝子を改変し、その後*piggyBac*の転移でマーカーを除去することで、複数のイネ内在遺伝子のピンポイント改変に成功した。この技術を利用することで、少なくともイネにおいてはあらゆる遺伝子座を狙い通りに改変することが可能になった²⁾。

1-2. 新規ポジティブ・ネガティブ選抜マーカーの開発

1-1で述べたように、イネにおいてはGT細胞を効率良く選

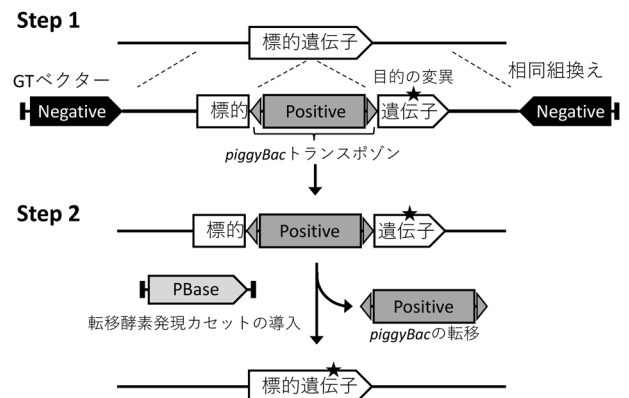


図2. ポジティブ・ネガティブ選抜を利用したGTと*piggyBac*によるマーカー除去を組合わせた標的遺伝子改変の概要
Step1, アグロバクテリウムを介してGTベクターをイネカルスに導入し、ポジティブ・ネガティブ選抜によりGT細胞を濃縮する。Step2, 抗生物質耐性カルスの中からPCR解析によりGT細胞を同定し、GT細胞に*piggyBac*転移酵素(PBase)発現カセットをアグロバクテリウムにより導入する。抗生物質耐性カルスから再分化個体を得て、再分化個体において*piggyBac*が標的遺伝子座から除去されていることを配列解析により確認する。*piggyBac* トランスポゾンの除去が確認された再分化個体から次世代を得て、それらの中から標的遺伝子に目的の変異をホモで持ち、PBase発現カセットを持たない個体を選抜する。

抜けるポジティブ・ネガティブ選抜法が確立されているが、この選抜法を利用したGT系が他の植物種に適用された例はこれまでにない。その原因の一つは、ネガティブ選抜マーカーとしてイネで使用されているジフテリアトキシン A サブユニット遺伝子がGTベクター上から一過的に発現することで、GTに成功した細胞をロスしているのではないかと考え、条件的(薬剤添加による選抜強度の調節が可能な)ネガティブ選抜マーカーを開発した。広範な植物種に適用可能な条件的ネガティブ選抜マーカーとして、ポジティブ選抜マーカーの発現を抑制する(*nptII*の発現をアンチセンス*nptII*で抑制する)ネガティブ選抜マーカー*nptII-anti nptII*を開発し、これを利用した選抜によって、内在性の遺伝子がGTによって正確に改変された細胞を濃縮することに成功した³⁾。

2. DNA修復経路の調節による相同組換え効率の向上

細胞内で生じたDSBsは、主に2つ(相同組換えと非同相末端結合)の経路によって修復されるが、高等真核生物では非同相末端結合経路で優先的に修復されるために相同組換え効率が極めて低い。そのために、相同組換えの鑄型を持つGTベクターを細胞内に挿入した際、相同組換えを起こさずに非同相末端結合経路でランダムにゲノムに挿入されてしまう。このことが、GT効率低下の一因である。そこで筆者らは、非同相末端結合関連因子のノックダウンイネを用いて、T-DNAのランダム挿入の抑制と相同組換え効率の向上が見られることを明らかにした⁴⁾。また、非同相末端結合のバックアップ経路で機能するDNA polymerase θ (PolQ)のT-DNA挿入における役割についても明らかにし、PolQ欠損イネでは20%程度にまでT-DNAのランダム挿入が抑制されることを見出した⁵⁾。これらのことから、非同相末端結合経路の抑制はGT効率の向上に効果的であることが示唆されたが、恒常的な抑制は不必要な突然変異の誘発などが懸念される。そこで現在、非同相末端結合経路の阻害剤の利用によりGT効率を向上できるかを検討している。

3. 人工制限酵素による標的切断誘導的なGT系の開発

GTは相同組換え修復を介していることから、DSBsが標的

遺伝子上に誘発されることが起点となる。従って、人工制限酵素による標的遺伝子の切断は、GT効率を顕著に向上させることが動物細胞を用いた研究で明らかになっている。そこで、人工制限酵素CRISPR/Cas9を併用したGT系を開発した。これは、CRISPR/Cas9発現カセットとGTの鑄型配列を一つのベクターに配置したall-in-one GTベクターを利用する簡便な方法(図3)で、標的遺伝子とゲノムに組み込んだベクター上の鑄型配列との相同組換えにより標的遺伝子を改変する。形質転換細胞の選抜時に相同組換えの活性化剤を処理することによりGT効率を向上させ、イネだけでなくタバコにおいても内在性遺伝子の改変に成功した⁶⁾。

おわりに

近年、DSBを伴わないCRISPR/Casを利用した塩基置換法(ベースエディター)が広く利用されているが、標的部位や塩基置換の方向性に制限があり、標的遺伝子を狙い通りに改変するには不十分である。一方、相同組換えを介したGT技術は、レポーター遺伝子やタグ配列のノックイン、連続する複数の塩基置換の同時挿入など、標的遺伝子を望み通りに改変することができる。現時点では、未だGT効率は満足できるものではなく適用できる植物種も限定的であるが、今後も様々なアプローチによりGT効率の改良を続け、より汎用的なGT系を確立することで基礎研究のみならず作物の品種改良などの応用を目指した研究においても貢献したい。

(引用文献)

- 1) Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Osakabe K, Saika H, Toki S. *Plant J.* **77**, 454-463 (2014)
- 2) Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Ohtsuki N, Saika H, Toki S. *Plant J.* **81**, 160-168 (2015a)
- 3) Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Osakabe K, Saika H, Toki S. *Plant Physiol.* **169**, 362-370 (2015b)
- 4) Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Saika H, Kwon YI, Osakabe K, Toki S. *New Phytol.* **196**, 1048-1059 (2012)
- 5) Nishizawa-Yokoi A, Saika H, Hara N, Lee LY, Toki S, Gelvin SB. *New Phytol.* **229**, 2859-2872 (2021)
- 6) Nishizawa-Yokoi A, Mikami M, Toki S. *Front. Genome Ed.* **2**, 14 (2020)

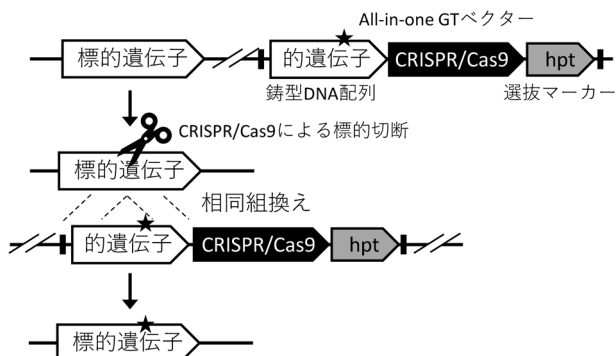


図3. all-in-one GTベクターを用いたCRISPR/Cas9による標的変異誘導的なGT系

GT鑄型DNA配列、CRISPR/Cas9 (gRNA, Cas9) 発現カセット、選抜マーカーを一つのT-DNAに配置したall-in-one GTベクターを植物細胞に導入し、形質転換細胞の選抜の過程でCRISPR/Cas9による標的切断が生じる。その多くは非同相末端結合による修復エラーで欠損や挿入変異が生じるが、ごく稀にゲノムに挿入されたベクター上の鑄型配列を利用した相同組換え修復が生じ、目的の変異(★印)が標的遺伝子に挿入される。

謝辞 本研究は、農研機構生物機能利用研究部門における研究から得られたものです。特別研究員時代から現在に至るまで、温かいご指導ご鞭撻を賜りました土岐精一先生(農研機構生物機能利用研究部門ゲノム編集技術改変ユニット前ユニット長)、研究を続ける機会を与えてくださり、研究者としての心構えを一から教えてくださった重岡成先生(近畿大学附属農場農場長・特任教授)に心より感謝いたします。常日頃より本研究を支えてくれた研究室のテクニカルスタッフの皆様、本研究にご協力いただいた共同研究者の皆様、様々なご助言をくださった研究室の同僚の皆様へ深く御礼申し上げます。また、育児と研究の両立には、研究費の援助、研究室の皆様の理解と支援、両親と家族のサポートが不可欠でした。本研究を資金面、技術面、精神面で支援してくださった全ての機関、全ての方々に厚く御礼申し上げます。最後になりましたが、農芸化学女性研究者賞にご推薦くださいました重岡成先生、ならびにご支援賜りました石川孝博先生(島根大学教授)、学会の先生方に感謝いたします。